Freelite™ Human Lambda Free Kit for use on the MININEPHPLUS™

For *in-vitro* diagnostic use

Product Code: VK018

Product manufactured by:
The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.
www.bindingsite.co.uk

Telephone: +44 (0)121 436 1000
Fax: +44 (0)121 430 7061
e-mail: info@bindingsite.co.uk

MININEPHPLUS™ and **Freelite™** are trademarks of The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK.

CE

1 INTENDED USE

This kit is intended for the quantitation of lambda free light chains in serum on the MININEPHPLUS. Measurement of free light chains aids in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma, lymphocytic neoplasms, Waldenström's macroglobulinemia, AL amyloidosis, light chain deposition disease and connective tissue diseases such as systemic lupus erythematosus in conjunction with other laboratory and clinical findings.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Immunoglobulin molecules consist of two identical heavy chains (α, δ, ε, γ or μ) which define the immunoglobulin class and two identical light chains (κ or λ). Each light chain is covalently linked to a heavy chain and the two heavy chains are linked covalently at the hinge region. In healthy individuals, the majority of light chain in serum exists in this form, bound to heavy chain. However, low levels of free light chain (FLC) are found in serum of normal individuals due to the over-production and secretion of FLC by the plasma cells. Whilst the molecular weight of both light chains is ≈22.5kD, in serum κ free light chain (κ-FLC) exists predominantly as a monomer and λ free light chain (λ-FLC) as a covalently linked dimer with a molecular weight of ≈45kD. This will lead to a differential glomerular filtration rate for κ-FLC and λ-FLC and may explain the observed ratio of κ-FLC to λ-FLC of 0.625 in serum compared to the ratio of bound κ to λ of 2.0.

Elevated serum levels of monoclonal FLC are associated with malignant plasma cell proliferation (eg. multiple myeloma), AL amyloidosis and light chain deposition disease. Raised serum levels of polyclonal FLC may be associated with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus [1-13].

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

Evaluating the concentration of a soluble antigen by nephelometry involves the addition of the test sample to a solution containing the appropriate antibody in a reaction vessel or cuvette. A beam of light is passed through the cuvette and as the antigen-antibody reaction proceeds, the light passing through the cuvette is scattered increasingly as insoluble immune complexes are formed. Light scatter is monitored by measuring the light intensity at an angle away from incident light. The antibody in the cuvette is in excess so the amount of immune complex formed is proportional to the antigen concentration. Concentrations are automatically calculated by reference to a calibration curve stored upon the calibration card. The sensitivity of nephelometric assays can be increased by the use of particle enhancement [6]. This entails linking the antibody to a suitably sized particle that increases the relative light-scattering signal of the antigen-antibody reaction.

4 REAGENTS

4.1 Human lambda free reagent: Consisting of monospecific antibody coated onto polystyrene microparticles. Supplied in lyophilised form, reconstitute with 0.75mL of distilled water and put on a roller mixer for 30 minutes before use. It contains 0.099% sodium azide, 0.05% ProClin™, 0.1% E-amino-n-caproic acid (EACA) and 0.01% benzamidine as preservatives.

4.2 Lambda free swipe card: This is encoded with details of the reaction curve specific to the respective lot of reagent. This card is reagent lot specific and must be used only with the reagent lot stated.

4.3 Lambda free supplementary buffer: For use with the identical lot of Lambda Free reagent, swipe card and controls only. The supplementary buffer contains 0.099% sodium azide as a preservative.

4.4 Controls: These consist of pooled human sera that contain polyclonal Lambda Free light chain. They are supplied in stabilised liquid form that contain 0.099% sodium azide, 0.1% EACA and 0.01% benzamidine as preservatives. The acceptable ranges of Human Lambda Free concentrations are stated on the batch specific Quality Control certificate (VIN018.QC) accompanying the kit.

ProClin™ is a trademark of Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

5 CAUTION

All donors of human serum supplied in this kit have been serum tested and found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to human immunodeficiency virus (HIV1 and HIV2) and hepatitis C virus. The assays used were either approved by the FDA (USA) or cleared for *in vitro* diagnostic use in the EU (Directive 98/79/EC, Annex II); however, these tests cannot guarantee the absence of infective agents. Proper handling and disposal methods should be established as for all potentially infective material, including (but not limited to) users wearing suitable gloves, protective equipment and clothing at all times. Only personnel fully trained in such methods should be permitted to perform the procedures.

This product contains sodium azide and ProClin 300 and must be handled with caution. Do not ingest or allow contact with the skin (particularly broken skin or open wounds) or mucous membranes. If contact does occur wash with a large volume of water and seek medical advice. Explosive metal azides may be formed on prolonged contact of sodium azide with lead and copper plumbing; on disposal of reagent, flush with a large volume of water to prevent azide build up.

This product should only be used by suitably trained personnel for the purposes stated in the Intended Use. Strict adherence to these instructions is essential at all times. **Results are likely to be invalid if parameters other than those stated in these instructions are used**

Reagents from different batch numbers of kits are **NOT** interchangeable. If large numbers of tests are performed care should be taken to ensure that all the reagents are from the same kit lot.

6 STORAGE AND STABILITY

The unopened kits should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date given on the kit box label. DO NOT FREEZE. Once reconstituted, the reagent is stable for 5 days when stored at 2-8°C. It is recommended that reagent bottles are used consecutively. The supplementary buffer should be allowed to equilibrate to room temperature prior to use. Opened supplementary buffer and controls are stable for 1 month when stored at 2-8°C.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use fresh or deep frozen serum samples. Serum should be obtained by venepuncture, allowed to clot and the serum separated as soon as possible to prevent haemolysis. Samples may be stored at 2-8°C for up to 21 days, but for prolonged storage they should be kept frozen at -20°C or below. Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. Microbially contaminated serum samples, samples containing particulate matter and lipaemic or haemolysed serum samples should not be used. Some types of sera are not suitable for MININEPHPLUS assays – see section 11.1.1

8 METHODOLOGY

Note: To enable full interpretation of results, free Kappa/Lambda ratios should be determined: samples must therefore be assayed using Binding Site's MININEPHPLUS **Freelite** Kappa Free Kit (VK016).

8.1 Materials provided

8.1.1 2 x 0.75mL *Human Lambda Free Reagent*
8.1.2 1 x 3.5mL *Lambda Free Supplementary Buffer*
8.1.3 1 x 0.5mL *Human Lambda Free High Control*
8.1.4 1 x 0.5mL *Human Lambda Free Control*
8.1.5 Magnetic swipe card containing lot specific calibration information
8.1.6 Quality Control Certificate
8.1.7 Instruction leaflet

8.2 Materials required but not provided

8.2.1 MININEPHPLUS analyser (AD500.C/.D/.E)
8.2.2 MININEPHPLUS printer (AP1310DPK1T63) (Optional)
8.2.3 MININEPH Reagent Accessory Pack (ZK500.R)
8.2.4 MININEPHPLUS On-Board Buffer 1 (SN107)
8.2.5 A range of pipettes capable of dispensing 5-1000μL
8.2.6 Pipette tips for use with the MININEPHPLUS – refer to MININEPHPLUS User Guide.
8.2.7 Equipment for the collection and preparation of test samples
8.2.8 A roller mixer
8.2.9 Distilled water

8.3 Test procedure

8.3.1 Summary of reagent volumes added to the cuvette:

Reagent	Volume added
Sample (1/20 dilution)	40μL
Lambda Free Supplementary Buffer	100μL
Human Lambda Free Reagent	40μL

8.3.2 Ensure there is sufficient On-Board Buffer 1 to perform the tests. Refer to the MININEPHPLUS User Guide for instructions on replenishing the buffer.
8.3.3 Check that the waste pot is under the hand-held pipette stand at the back of the MININEPHPLUS and is empty.
8.3.4 Attach a pipette tip to the hand-held pipette and place back into the pipette holder.
8.3.5 Switch the analyser on.
8.3.6 *Enter chemistry number*. Enter the chemistry number (LAM = 18) and press **enter**.
8.3.7 *Swipe chemistry card*. This message will only be displayed if this chemistry has never been used before or you wish to change reagent lot number. Pass the swipe card through the swipe card reader moving in a left to right direction across the front of the analyser. The magnetic stripe should be facing upwards.
8.3.8 *Check reagent lot number*. Press **enter.**
8.3.9 *LAM lot xxxx. OK? 1=Y 2=N.* Compare the details displayed with those on the reagent label and swipe card. If the lot number displayed is identical to the four digits of the lot number printed on the reagent vial and swipe card, select Y (press **1**) and continue to step 8.3.10. If the lot number is different from those displayed select N (press **2**) and return to step 8.3.7 to allow the details of the correct lot to be entered.
8.3.10 *Prime? 1=Y 2=N.* Prime the analyser to expel air bubbles in the plastic tube leading from the On-board buffer bottle to the hand-held pipette. This is done by pressing button **1** when prompted. Excess On-board buffer will be expelled into the waste pot. When priming has finished press **2.**
8.3.11 *Block N Pipette N.* Allow analyser to warm to operating temperature. The correct operating temperature is coded in the calibration card.
8.3.12 Prepare dilutions of controls and samples using the MININEPH Sample Diluent supplied in the MININEPH Reagent Accessory Pack (ZK500.R). The recommended sample dilution for Lambda is 1/20 (to prepare this dilution pipette 40μL of sample into a sample dilution tube and add 760μL of sample diluent).
8.3.13 Prepare one MININEPH cuvette for each sample to be assayed. Using the forceps provided with the MININEPHPLUS place a stirring bar in each cuvette and then using a pipette add 40μL of diluted sample carefully to the bottom of each cuvette.
8.3.14 *Enter sample ID*. Enter an identity code (e.g. 1) for the first sample to be assayed then press **enter** to continue (refer to User Guide for choice of identity codes).
8.3.15 *Sample dilution 1/20.* Accept the recommended dilution by pressing **enter** or type in a new dilution factor if an alternative dilution is to be used.
8.3.16 *Place cuvette in chamber*. Place a cuvette containing a stirring bar and 40μL of diluted sample in the cuvette chamber. Press the cuvette down gently until it reaches the bottom of the chamber. The cuvette will be detected automatically.
8.3.17 *Temperature Stabilising.* There is a waiting period of 90 seconds whilst the sample in the cuvette is warmed inside the analyser.
8.3.18 *Add reagent.* Using the MININEPHPLUS hand-held pipette, aspirate the Human Lambda Free Reagent
8.3.19 *Air Gap*. Using the MININEPHPLUS hand-held pipette, aspirate an air gap.
8.3.20 *Supplementary.* Using the MININEPHPLUS hand-held pipette, aspirate the Lambda Free Supplementary Buffer.
8.3.21 *Add Reagent.* Dispense the aspirated reagents into the cuvette. The stirring bar will rotate and the assay will begin. After a 30 second blanking time the assay will take 150 seconds to complete. The result will be displayed. Results will be automatically printed if a printer is connected.

8.3.22 If the analyser indicates the result is higher than the intended measuring range (displayed as > or mg/L XS), re-assay the sample at a higher dilution of 1/200 (900µL MININEPH Sample Diluent + 100µL sample diluted 1/20). The sample dilution should be entered as 1/200 (see section 10.2).

8.3.23 On completion of the assay remove the cuvette and press **enter** to perform the next assay.

8.3.24 When all assays for the chosen chemistry have been completed press escape (**esc**) and select the chemistry number for the next set of assays.

8.3.25 Empty waste pot and discard the pipette tip from the hand held pipette.

9 QUALITY CONTROL

The controls provided should be included in all assay runs. The acceptable lambda free concentration ranges are stated on the accompanying Quality Control certificate (VIN018.QC). Results obtained during the run should only be accepted if the control results obtained are within the ranges stated.

Should a control measurement be out of range when assayed with a stored curve the control values should be re-measured. If repeat results are still out of range, the analyser should be checked before repeating the assay. If problems persist, refer to supplier.

10 INTERPRETATION OF RESULTS

10.1 Results are calculated by the analyser and displayed in mg/L. If a printer is attached the result is automatically printed out together with the patient identification code and the sample dilution. Further calculations are not necessary.

10.2 All samples must be assayed first at the standard 1/20 assay dilution, giving an approximate measuring range of 4.91-98.3mg/L. For samples measuring over the upper limit of the curve with an analyser dilution of 1/20, the following dilution series should be used to minimise reagent usage.

Overall Dilution	Sample (µL)	Saline diluent (µL)	Lambda Approx measuring range (mg/L)
1/20 sample dilution	40µL of neat sample	760µL	4.91-98.30
1/200 sample dilution	100µL of 1/20 dilution	900µL	49.1-983.0
1/2000 sample dilution	100µL of 1/200 dilution	900µL	491-9830
1/20000 sample dilution	100µL of 1/2000 dilution	900µL	4910-98300

10.3 Antigen excess:
The MININEPHPLUS monitors the reaction kinetics of each sample and compares the results with reaction limits set through testing of an extensive myeloma library. Samples detected as being in excess are flagged (mg/L XS) and need to be remeasured at a higher sample dilution (see Section 11.1.3).

10.4 When diluted, the sample stability is not guaranteed. At 1/20 sample dilution; samples are stable for 2 hours at 21°C. Higher dilutions should be assayed immediately after preparation.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE

11.1 Specific test limitations

11.1.1 Nephelometric assays are not suitable for measurement of highly lipaemic or haemolysed samples or samples containing high levels of circulating immune complexes (CIC) due to the unpredictable degree of non-specific scatter these sample types may generate. Unexpected results should be confirmed using an alternative assay method.

11.1.2 Diagnosis cannot be made and treatment must not be given on the basis of free light chain measurements alone. Clinical history and other laboratory findings must be taken into account.

11.1.3 **Antigen excess**: A small proportion of patient samples containing high concentrations of free kappa or free lambda can give a falsely low result for the "involved" light chain due to antigen excess. The amino acid composition of the light chain produced by an individual B cell clone will influence the level at which a sample may show antigen excess with the **Freelite** assay. In almost every case the concentration of the involved light chain will still be above the quoted normal range (3.30-19.40mg/L for free kappa and 5.71-26.30mg/L for free lambda) and/or the opposite light chain concentration will be below the quoted range and/or the free kappa/free lambda ratio will be outside the quoted range (0.26-1.65). Samples should be tested at both 1/20 and 1/200 dilutions in order to detect antigen excess if any of the following conditions are met:

a) sample shows either a free light chain concentration or a free kappa/free lambda ratio outside of the quoted range,
b) sample is from a patient that has previously demonstrated antigen excess,
or
c) sample result does not agree with other clinical or laboratory findings.

11.1.4 Each monoclonal FLC contains unique amino acid combinations. It is therefore theoretically possible for certain monoclonal proteins to be undetectable by immunoassay leading to lower than expected measurements. In practice this occurs extremely rarely with the **Freelite** assay. Suspected samples should first be tested for antigen excess (see section 11.1.3 above) then further investigation by other laboratory methods (immunofixation and serum protein electrophoresis).

11.1.5 The nature of monoclonal proteins can cause a non-linear response in immunoassays, potentially leading to inconsistent results; this can be prevented by always diluting the samples in the sequence 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000. Omitting a dilution step should be avoided.

11.1.6 Due to the highly variable nature of monoclonal proteins, different reagent batches may react differently to the epitopes in some patient samples. In these instances, sample results may vary when tested using multiple batches Care should be taken when monitoring patients across multiple reagent lots. We recommend, wherever possible, that previous and current samples are tested on new reagent lots and the results compared.

11.2 Trouble shooting

Problem	Possible causes(s)	Suggested action(s)
Error message "Blank too high – reassay" displayed.	Very high analyte concentration.	Reassay sample at a higher dilution.
	Lipaemic, turbid or haemolysed samples.	Try alternative assay method.
Controls out of range.	Product deterioration.	Check expiry date.
	Operator error.	Repeat assay with the correct sample dilution.
Test sample giving unexpectedly low result.	Antigen excess.	Repeat assay at higher dilution. Check if the two results agree.

12 EXPECTED RESULTS

The ranges provided below have been obtained from a limited number of samples and are intended for guidance purposes only. Wherever possible it is strongly recommended that local ranges are generated.

12.1 Adult serum ranges

282 normal subjects aged from 20 to 90 years were assayed using the Binding Site **Freelite** assays for the BN™II* [11]. The results are shown in the table below.

Normal adult serum	Mean conc.	Median conc.	95 Percentile range
Free kappa	8.36 (mg/L)	7.30 (mg/L)	3.30 - 19.40 (mg/L)
Free lambda	13.43 (mg/L)	12.40 (mg/L)	5.71 - 26.30 (mg/L)
	Mean	**Median**	**Total range**
Kappa/Lambda ratio	0.63	0.60	0.26 - 1.65

**BN™ is a trademark of Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Precision

Lambda precision summary				
	Conc. (mg/L)	Intra-batch CV% (n=20*)	Day to day CV% (n=10**)	Inter-instrument CV% (n=5***)
Serum 1	80.54	5.1	6.7	6.1
Serum 2	29.42	3.9	3.8	5.1
Serum 3	7.62	3.2	7.4	6.5

*Intra-batch data: this data represents the coefficient of variation (CV) of twenty within-run measurements at three analyte concentrations.
**Day-to-day data: the measurements were performed on ten separate occasions and the overall CV of the results at each concentration was calculated.
***Inter-instrument data: assays were performed at three different concentrations, in duplicate on each of five instruments. The CV of the results at each concentration was calculated.

13.2 Linearity
The linearity of this assay was confirmed using a serially diluted polyclonal serum sample, which gave a regression plot of $y = 0.91x + 1.07$ *(mg/L),* $r^2 = 0.984$ (y = measured free lambda concentration, x = theoretical concentration).

13.3 Interference
Minimal assay interference by 200mg/L bilirubin (1.95%), 5.0g/L haemoglobin (4.90%) and (15000 formazine turbidity units) chyle (-7.41%) was demonstrated using a 57.1mg/L free lambda control serum.

13.4 Limit of Blank and Limit of Detection
The limit of quantitation and detection for this assay is defined as the lowest point of the calibration curve i.e. 4.91mg/L based upon a 1/20 sample dilution.

13.5 Comparison
95 normal adult sera and 30 clinical adult sera (from known/suspected multiple myeloma and systemic lupus erythematosus patients) were tested on the **Freelite** MININEPHPLUS and **Freelite** BNII assays. Results were as follows:

	Normal and clinical sera
Range (mg/L)	7.90 – 8680
Passing Bablok regression (mg/L)	1.03x – 1.36
linear regression R^2	0.9798

14 REFERENCES

1. Cole PW, Durie BGM, Salmon SE. (1978) Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
2. Pescali E, Pezozoli A, (1988) The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
3. Solling K, Solling J, Romer FK. (1981) Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
4. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR. (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RJ (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**:4, 673-680.
6. Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of $F(ab')_2$-based, latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. Clin. Chem **46**:6, Suppl. 2000, 705, pA181.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT. (2003) Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
8. Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
9. Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J.Haem. **122**: 78-84.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002) Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA. (2002) Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
12. Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5th Edition, 221-228. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
13. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Heamatol. **126**, 348-354.

Freelite™ Human Lambda Free Kit zur Verwendung auf dem MININEPHPLUS™

Zur *in-vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: VK018

In England hergestellt von:
The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.
www.bindingsite.co.uk

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:
The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A,
D-68723 Schwetzingen, Deutschland
Telefon: +49 (0) 6202 92 62 0
Fax: +49 (0) 6202 92 62 222
e-mail: office@bindingsite.de

MININEPHPLUS™ und **Freelite**™ sind Warenzeichen von The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK.

CE

1 VERWENDUNGSZWECK

Dieser Kit dient zur quantitativen Bestimmung der Freien Leichtkette ‚Lambda' im Serum unter Verwendung des MININEPHPLUS. Die quantitative Bestimmung der Freien Leichtketten unterstützt die Diagnose und die Verlaufskontrolle bei Multiplem Myelom, lymphozytären Tumoren, Morbus Waldenström, AL-Amyloidose, Light Chain Deposition Disease und Bindegewebserkrankungen wie z.B. Systemischer Lupus erythematodes (SLE) zusammen mit anderen Befunden aus Labor und Klinik.

2 EINFÜHRUNG

Immunglobulin-Moleküle setzen sich aus zwei identischen schweren Ketten (α, δ, ε, γ oder μ), durch die die Immunglobulinklasse definiert wird und zwei identischen Leichtketten (κ oder λ) zusammen. Jede Leichtkette ist kovalent an eine schwere Kette gebunden. Die zwei schweren Ketten sind in der Gelenks-Region ebenfalls miteinander kovalent verknüpft. Im Serum von gesunden Individuen kommt die Mehrheit der Leichtketten in dieser Form, also an die schwere Kette gebunden, vor. Allerdings werden auch geringe Mengen an Freien Leichtketten (FLC) im Serum von Gesunden gefunden, da die Plasmazellen sie im Überschuss produzieren und sekretieren. Das Molekulargewicht der Leichtketten (κ und λ) beträgt ca. 22,5kD. Im Serum kommt die Freie Kappa-Leichtkette (κ-FLC) überwiegend als Monomer, die Freie Lambda-Leichtkette (λ-FLC) als kovalent-gebundenes Dimer, mit einem Molekulargewicht von ca. 45kD, vor. Dies führt zu einer unterschiedlichen Filtrationsrate für κ-FLC und λ-FLC, was eine mögliche Erklärung des im Serum gefundenen κ-FLC/λ-FLC Verhältnis von 0,625 ist. Das κ /λ-Verhältnis der gebundenen Leichtketten ist dagegen 2,0.

Erhöhte Serumkonzentrationen an monoklonalen Freien Leichtketten sind mit der malignen Proliferation von Plasmazellen (z.B. Multiples Myelom), AL-Amyloidose und der Ablagerung von Freien Leichtketten (free light chain deposition disease) assoziiert. Erhöhte Serumkonzentrationen an polyklonalen Freien Leichtketten können bei Autoimmunerkrankungen wie SLE auftreten[1-13].

3 PRINZIP

Zur Bestimmung eines löslichen Antigens mittels Nephelometrie wird die zu testende Probe in eine Küvette, die den entsprechenden Antikörper enthält, zugegeben. Beim Fortschreiten der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der unlösliche Immunkomplexe gebildet werden, wird das in die Küvette eingestrahlte Licht zunehmend gestreut. Die Lichtstreuung wird ermittelt, indem die Lichtintensität in einem bestimmten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gemessen wird. Da der Antikörper im Überschuss vorliegt, ist die Immunkomplexbildung proportional zur Antigen-konzentration. Die Antigenkonzentration wird automatisch anhand einer Kalibrationskurve, die auf der Magnetkarte gespeichert ist, berechnet. Die Empfindlichkeit von nephelometrischen Tests kann durch eine Partikelverstärkung erhöht werden[6]. Dazu wird der Antikörper an einen Partikel geeigneter Größe gekoppelt, dadurch wird das relative Streulichtsignal während der Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt.

4 REAGENZIEN

4.1 Human Lambda Free Reagenz: Besteht aus monospezifischen Schaf-Antikörpern, die an Polystyren-Latexpartikel gekoppelt wurden. Das Reagenz wird in lyophilisierter Form geliefert. Rekonstitution erfolgt mit 0,75mL destillierten Wasser und wird vor Gebrauch für 30 Minuten in rotierenden Bewegungen gemischt. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,05% ProClin™*, 0,1% E-aminocapronsäure (EACA) und 0,01% Benzamidin.

4.2 Lambda Free Magnetkarte: Auf der Magnetkarte ist die chargenspezifische Kalibrationskurve gespeichert. Diese Karte darf nur mit Reagenz der entsprechenden Charge verwendet werden.

4.3 Lambda Free Zusatzreagenz: Nur im Gebrauch mit der identischen Chargennummer von Freiem-Lambda-Reagenz, Magnetkarte und Kontrollen verwenden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid.

4.4 Human Lambda Free Kontrollen (Low Level und High Level): Sie werden aus normalem Humanserum hergestellt und enthalten polyklonales Freies Lambda und liegen als stabilisierte Flüssigkeiten vor. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin. Der erlaubte Bereich für die Freie-Lambda-Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat (VIN018.QC) angegeben, das dem Kit beiliegt.

ProClin™ ist ein Warenzeichen von Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

5 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das Ausgangsmaterial zur Erstellung der Kalibratoren und Kontrollen stammt aus menschlichem Blut. Jede Einzelspende wurde bezüglich Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Virus (HIV 1 & 2), Hepatitis-C-Virus und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) untersucht und als negativ befunden. Die hierfür verwendeten Tests sind entweder von der FDA (USA) zugelassen oder für den Gebrauch in der *in vitro* Diagnostik in der EU freigegeben (Directive 98/79/EC, Annex II). Es gibt aber zur Zeit keine absolut sicheren Testmethoden zum Auschluss von HIV-, Hepatitis-C-Virus-, Hepatitis-B-Virus- und anderen Infektionsträgern. Deshalb sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Umgangs- und Entsorgungsmethoden sollten denen für potentiell infektiösem Material entsprechen, insbesondere dem ständigen Tragen entspechender Schutzkleidung. Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Dieses Produkt enthält Natriumazid und ProClin 300 und muss mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Verschlucken sowie Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser nachspülen um Azidablagerungen zu vermeiden.

Dieser Test sollte nur für den angegebenen Verwendungszeck von entsprechend geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Einhaltung der Arbeitsanleitung wird empfohlen. **Bei Verwendung von abgeänderten Testparametern kann die Richtigkeit der Ergebnisse nicht garantiert werden.**

Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen **NICHT** untereinander gemischt oder gemeinsam verwendet werden. Bei großem Testdurchsatz muss darauf geachtet werden, dass alle Reagenzien der gleichen Charge entstammen.

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Der ungeöffnete Kit ist bei 2-8°C bis zum auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar. NICHT EINFRIEREN! Nach Rekonstitution ist das Reagenz, wenn es bei 2-8°C gelagert wird, 5 Tage stabil. Es wird empfohlen die Reagenzflaschen nacheinander zu verwenden. Das Zusatzreagenz vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach dem Öffnen sind Zusatzreagenz und Kontrollen bei Lagerung bei 2-8°C bis zu 1 Monat stabil.

7 PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG

Immer frisches oder tiefgefrorenes Serum verwenden. Blutproben über Venenpunktur sammeln und auf natürliche Weise gerinnen lassen. Serum so schnell wie möglich vom Gerinnsel trennen um eine Hämolyse zu vermeiden. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 21 Tage vor dem Test gelagert warden. Für eine längere Lagerung wird empfohlen die Proben unverdünnt bei mindestens -20°C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Keine mikrobiell oder mit Partikeln verunreinigte Proben, oder hämolytisches oder lipämisches Serum verwenden. Einige Serentypen sind für die Verwendung auf dem MININEPHPLUS nicht geeignet – siehe Abschnitt 11.1.1.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweis: Um eine vollständige Interpretation der Ergebnisse durchführen zu können, sollte das Verhältnis ‚Freies Kappa : Freies Lambda' berechnet werden. Deshalb sollten die Proben ebenfalls mit dem MININEPHPLUS **Freelite** Kappa Freie Leichtketten Kit (Bestell-Nr.: VK016) von Binding Site gemessen werden.

8.1 Gelieferte Materialien

8.1.1 2 x 0,75mL *Human Lambda Free Reagent* (Latexreagenz*)*
8.1.2 1 x 3,5mL *Lambda Free Supplementary Buffer* (Zusatzreaganz*)*
8.1.3 1 x 0,5mL *Human Lambda Free High Control* (Freies Lambda Kontrolle, High Level)
8.1.4 1 x 0,5mL *Human Lambda Free Control* (Freies Lambda Kontrolle, Low Level)
8.1.5 Magnetkarte mit chargenspezifischer Kalibrationskurve
8.1.6 QC-Zertifikat
8.1.7 Arbeitsanleitung

8.2 Benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

8.2.1 MININEPHPLUS Instrument (AD500.C/.D/.E)
8.2.2 MININEPHPLUS Drucker (AP1310DPK1T63) (Optional)
8.2.3 MININEPH Reagenzienzubehör-Kit (ZK500.R)
8.2.4 MININEPHPLUS Systempuffer 1 (SN107)
8.2.5 Pipetten (5-1000µL)
8.2.6 Pipettenspitzen zur Verwendung auf dem MININEPHPLUS – siehe MININEPHPLUS Bedienungsanleitung.
8.2.7 Laborausstattung zum Sammeln und Vorbereiten der Proben
8.2.8 Rollmischer
8.2.9 Destilliertes Wasser

8.3 Testdurchführung

8.3.1 Übersicht der zu pipettierenden Reagenz-Volumina:

Reagenzien	Volumen
Probe (1/20-Verdünnung)	40µL
Freies-Lambda-Zusatzreagenz	100µL
Freies-Lambda-Reagenz	40µL

8.3.2 Stellen Sie sicher, dass genügend Systempuffer 1 vorhanden ist, um die Teste durchführen zu können. Siehe MININEPHPLUS Bedienungsanleitung bezüglich des Auffüllens von Puffer.
8.3.3 Überprüfen Sie, dass der Abfallbehälter leer ist und sich unterhalb der Pipette befindet.
8.3.4 Setzen Sie eine Pipettenspitze auf die Pipette und stellen Sie diese in den Halter zurück.
8.3.5 Das MININEPHPLUS anschalten.
8.3.6 *Eingabe Test-Nr*. Nummer des Tests (LAM=18) eingeben und **Enter-Taste** drücken.
8.3.7 *Magnetkarte durchziehen*. Diese Meldung erscheint nur wenn der Test zum erstenmal durchgeführt wird oder die Chargen-Nummer des Antiserums geändert werden soll. Ziehen Sie die Magnetkarte von links nach rechts durch das Lesegerät. Die Karte so halten, dass der Magnetstreifen nach oben zeigt.
8.3.8 *Reagenziencharge überprüfen*. **ENTER-Taste** drücken**.**
8.3.9 *LAM lot xxxx. OK? 1=Ja 2=Nein*. Überprüfen Sie ob die angezeigte Lot-Nummer mit denen auf dem Etikett des Reagenzes und der Magnetkarte übereinstimmt. Sind die Lot-Nummern identisch Ja (Taste 1) drücken und mit Schritt 8.310 fortfahren. Sind die Lot-Nummern unterschiedlich: Nein (Taste 2) drücken und zu Schritt 8.3.7 zurückkehren und die Daten der richtigen Lot-Nummer eingeben (Magnetkarte).
8.3.10 *Spülen ? 1=Ja 2=Nein*. Spülen Sie das Gerät durch, um Luftblasen in den Schläuchen vom Systempuffer bis zur Pipette zu entfernen, indem die Taste **1** gedrückt wird. Überschüssiger Systempuffer wird über den Abfallbehälter entsorgt. Nach dem Spülen die Taste **2** drücken.
8.3.11 *Opt. Einheit N Pipette N*. Warten Sie bis das Gerät die Betriebstemperatur erreicht hat. Die richtige Temperatur ist in der Magnetkarte gespeichert.
8.3.12 Die Verdünnungen der Kontrollen und Proben mit dem MININEPH-Probendiluens aus dem MININEPH Reagenzienzubehör-Kit (ZK500.R) herstellen. Die

empfohlene Probenverdünnung für Lambda ist 1/20 (40µL Probe + 760µL Probendiluens).

8.3.13 Für jede zu messende Probe eine Küvette vorbereiten: Mit der Pinzette (ist MININEPHPLUS-Zubehör) in jede Küvette ein Magnet-Rührstäbchen geben und mit einer Pipette 40µL der Probe auf den Küvettenboden pipettieren.

8.3.14 *Probennummer eingeben*. Geben Sie die Proben-Identifikation ein (z.B. 1 für die erste Probe) und anschließend die **Enter-Taste** drücken. (Details zu Wahlmöglichkeiten bei der Proben-ID-Eingabe finden Sie in der Bedienungsanleitung).

8.3.15 *Probenverdünnung 1/20:* Durch Drücken der **ENTER-Taste** akzeptieren Sie diese Verdünnung. Wird eine andere Verdünnung gewünscht, diese an dieser Stelle eingeben.

8.3.16 *Küvette in Messkammer setzen:* Die Küvette mit Magnet-Rührstäbchen und 100µL verdünnter Probe in die Messkammer setzen. Die Küvette vorsichtig herunterdrücken bis der Boden erreicht ist. Das Gerät erkennt die Küvette automatisch.

8.3.17 *Stabilisierung der Temperatur*. Im Gerät wird die Probe in der Küvette aufgewärmt. Die Wartezeit beträgt 90 Sekunden.

8.3.18 *Reagenz zugeben*. Die elektronische Pipette mit Freiem-Lambda-Reagenz füllen.

8.3.19 *Luftblase.* Mit der elektronischen Pipette eine Luftblase ziehen.

8.3.20 *Zusatzreagenz*. Die elektronische Pipette mit Zusatzreagenz füllen.

8.3.21 *Reagenz zugeben*. Pipettieren Sie alle Reagenzien in die Küvette. Die Reagenzzugabe wird erkannt, der Testansatz automatisch gemischt und die Messung gestartet. Nach einer Anlaufzeit von 30 Sekunden, braucht der Test weitere 150 Sekunden bis er beendet ist. Ist die Messung beendet, erscheint das Ergebnis in der Anzeige und wird, falls ein Drucker angeschlossen ist, automatisch ausgedruckt.

8.3.22 Liegt das Ergebnis oberhalb des Messbereichs (angezeigt als > oder mg/L XS), sollte die Probe mit der höheren 1/200-Verdünnung (900µL MININEPH Probendiluens + 100µL Probe in der 1/20-Verdünnung) erneut gemessen werden. Bei der Abfrage der Probenverdünnung 1/200 in das Gerät eingeben (siehe Abschnitt 10.2).

8.3.23 Ist die Messung beendet, die Küvette entnehmen und die **ENTER**-Taste drücken damit die nächste Messung durchgeführt werden kann.

8.3.24 Sind alle Tests des angewählten Parameters gemessen worden, die **ESC**-Taste drücken und den nächsten Parameter anwählen.

8.3.25 Den Abfallbehälter leeren und die Pipettenspitze von der Pipette entfernen.

9 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, dass bei jedem Testansatz die mitgelieferten Kontrollen mitgeführt werden. Die zulässigen Freie Lambda Konzentrationbereiche sind auf dem beiliegenden QC-Zertifikat (VIN016.QC) angegeben. Ergebnisse sollten nur akzeptiert werden, wenn die Kontrollen innerhalb die angegebenen Konzentrationbereichen fallen.

Liegt eine Kontrolle außerhalb des Vertrauensberich, und wurde eine gespeicherte Kalibrationskurve verwendet, so wir empfohlen, diese erneut zu messen. Liegen die Kontrollen wiederholt außerhalb des Vertrauensbereich sollte das Gerät überprüft werden. Lässt sich das Problem nicht lösen, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

10 INTERPRETATION OF RESULTS

10.1 Die Ergebnisse werden direkt im Gerät berechnet und in mg/L angegeben. Ist ein Drucker angeschlossen, wird das Ergebnis zusammen mit der Probenidentifikation und –verdünnung automatisch ausgedruckt. Weitere Berechnungen sind nicht notwendig.

10.2 Alle Proben müssen zuerst in der Standardverdünnung von 1/20 gemessen werden, wobei der Messbereich bei 4,91–98,3mg/L liegt. Für alle Proben, die außerhalb dieses Bereichs liegen, sollte folgendes Verdünnungsschema angewandt werden, um den Verbrauch an Reaganz zu minimieren.

Gesamtverdünnung	Probe (µL)	NaCl-Diluens (µL)	Lambda ungefährer Messbereich (mg/L)
1/20 Probenverdünnung	40µL unverdünnte Probe	760µL	4,91–98,30
1/200 Probenverdünnung	100µL der 1/20 Verdünnung	900µL	49,1–983,0
1/2000 Probenverdünnung	100µL der 1/200 Verdünnung	900µL	491–9830
1/20000 Probenverdünnung	100µL der 1/2000 Verdünnung	900µL	4910–98300

10.3 Antigenüberschuss:
Der MININEPHPLUS überprüft die Reaktionskinetik jeder einzelnen Probenmessung und vergleicht die Ergebnisse mit entsprechenden Grenzen, die in einer Versuchsserie mittels einer umfangreichen Sammlung an Myelomproben ermittlet wurden. Proben, bei denen ein Antigenüberschuss vermutet wird, werden gekennzeichnet (mg/L XS) und sollte in einer höheren Probenverdünnung erneut gemessen werden (siehe Abschnitt 11.1.3).

10.4 Verdünnte Proben sind weniger stabil als unverdünnte Proben. Proben in der 1/20-Probenverdünnung sind bei 21°C 2 Stunden stabil. Höhere Verdünnungen sollten unmittelbar nach Herstellung gemessen werden.

11 GRENZEN DES TESTS

11.1 Spezifische Einschränkungen

11.1.1 Stark lipämische und hämolytische Seren sind für die Nephelometrie ungeeignet. Proben, die hohe Konzentrationen an zirkulierende Immunkomplexe (CIC's) enhalten, können mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da sie eine nicht vorhersagbare unspezifische Lichtstreuung erzeugen können. Bei unerwarteten Ergebnissen sollten diese durch eine alternative Messmethose bestätigt werden.

11.1.2 Die Diagnose und die Einleitung einer Therapie dürfen nicht ausschließlich auf der Bestimmung der Freien Leichtketten basieren. Das klinische Bild und andere serologische Befunde müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

11.1.3. **Antigenüberschuss:** Eine geringe Anzahl an Patientenproben, die hohe Konzentrationen an Freiem Kappa oder Freiem Lambda enthalten, kann aufgrund von Antigenüberschuss ein falsch-niedriges Ergebnis der „involvierten" Leichtkette erzeugen. Die Konzentration, bei der eine Probe eine Antigenüberschuss-Reaktion in dem **Freelite**-Test zeigen kann, ist von der Aminosäurenzusammensetzung der Leichtkette, die von einem individuellen B-Zell-Klon produziert wird, abhängig. In fast allen Fällen wird die Konzentration der erhöhten Freien Leichtkette immer noch oberhalb des angegebenen Normalbereichs liegen (3,30-19,40mg/L für Freies Kappa und 5,71-26,30mg/L für Freies Lambda) und/oder die andere Freie Leichtketten-Konzentration wird unterhalb des angegebenen Bereichs liegen und/oder das Verhältnis Freies Kappa zu Freiem Lambda (κ-λ-Ratio) wird außerhalb des geltenden Normalbereichs (0,26-1,65) liegen. Daher sollte jede Probe sowohl in der 1/20-Standardverdünnung als auch in der 1/200-Verdünnung erneut getestet werden, um einen Antigenüberschuss zu erfassen, wenn eine der folgenden Bedingungen zutrifft:

a) Die Probe weist eine Konzentration an Freien Leichtketten oder eine κ/λ-Ratio auf, die außerhalb der angegebenen Normalbereiche liegt.
b) Die Probe stammt von einem Patienten, bei dem bereits früher ein Antigenüberschuss gefunden wurde.
oder
c) Die Probenergebnisse stimmen nicht mit dem klinischen Bild oder anderen Laborbefunden überein.

11.1.4 Jede monoklonale Freie Leichtkette enthält einzigartige Aminosäuresequenzen. Daher ist es möglich, dass bestimmte monoklonale Freie Leichtketten durch den Immunoassay nicht erfasst werden, was sich in niedrigeren Messwerten als erwartet äußert. In der Praxis findet man dieses Phänomen bei Verwendung der **Freelite** Kits extrem selten. Fragliche Proben sollten zunächst auf Vorliegen eines Antigen-überschusses (siehe Abschnitt 11.1.3) überprüft und mit anderen Labormethoden (wie z. B. Immunfixation oder Serumeiweißelektrophorese) untersucht werden.

11.1.5 Der Charakter monoklonaler Proteine kann in Immunoassays zu einem nicht-linearen Verhalten führen, was möglicherweise in widersprüchlichen Ergebnissen resultiert. Dies kann verhindert werden, indem die Proben immer in der Reihenfolge 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000 verdünnt werden. Es sollte vermieden werden eine Verdünnung auszulassen.

11.1.6 Aufgrund der hohen Variabilität der monoklonalen Proteine, können verschiedene Reagenziencharge bei einigen Patientenproben möglicherweise mit den Epitopen einiger Freier Leichtketten unterschiedlich reagieren. In diesen Fällen können die Messergebnisse variieren, wenn die Probe mit verschiedenen Reagenziencharge gemessen wird. Falls bei der Verlaufskontrolle verschiedene Reagenziencharge verwendet werden, wird empfohlen, wenn möglich die vorhergehende Probe zeitgleich mit der aktuellen Probe zu messen und die entsprechenden Messergebnisse miteinander zu vergleichen.

11.2 Trouble shooting

Problem	Mögliche Ursache(n)	Empfohlene Maßnahmen
Fehlermeldung "Blank zu hoch – Wiederholungs-messung" wird angezeigt.	Sehr hohe Analyt-konzentration.	Probe mit einer höheren Verdünnung erneut messen.
	Lipämische, trübe oder hämolytische Probe.	Alternative Messmethode verwenden.
Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereichs.	Produkt verfallen.	Verfallsdatum überprüfen.
	Anwenderfehler.	Messung mit korrekter Verdünnung wiederholen.
Probe zeigt unerwartet niedriges Ergebnis.	Antigenüberschuss.	Test mit höherer Verdünnung wiederholen und überprüfen ob die beiden Ergebnisse übereinstimmen.

12 ERWARTETE WERTE

Die unten aufgeführten Normalbereiche basieren auf der Untersuchung eines normalen Spenderkollektivs und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen, wenn möglich, lokale Normbereiche zu bestimmen.

12.1 Erwachsene Normalbereich in Serum

282 normalen Individuen im Alter zwischen 20 to 90 wurden mit den Binding Site **Freelite** BN™II* Kits gemessen [(11)]. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:.

Normale Erwachsene Serum	Mittlere Konz.	Median Konz.	Bereich 95 Perzentile
Freies Kappa	8,36 (mg/L)	7,30 (mg/L)	3,30 – 19,40 (mg/L)
Freies Lambda	13,43 (mg/L)	12,40 (mg/L)	5,71 – 26,30 (mg/L)
	Mittelwert	**Median**	**Gesamtbereich**
Kappa/Lambda Ratio	0,63	0,60	0,26 – 1,65

**BN™ ist ein Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*

13 LEISTUNGSDATEN

13.1 Präzision

Lambda Präzision Zusammenfassung				
	Konz. (mg/L)	Intra-assay VK% (n=20*)	Tag zu Tag VK% (n=10**)	Gerätevariation VK% (n=5***)
Serum 1	80,54	5,1	6,7	6,1
Serum 2	29,42	3,9	3,8	5,1
Serum 3	7,62	3,2	7,4	6,5

*Intra-Assay Präzision: Diese Daten stellen den Variationskoeffizienten (VK%) von zwanzig Intra-Assay-Messungen von drei verschiedenen Analytkonzentrationen dar.
** Tag-zu-Tag Präzision: An 10 verschiedenen Tagen wurden Messungen durchgeführt. Der Gesamt-Variationskoeffizient (VK%) wurde pro Analytkonzentration berechnet.
***Gerätevariation: Drei verschiedene Seren mit unterschiedlichen Freie-Kappa-Konzentrationen wurden in Doppelbestimmung auf fünf verschiedenen Geräten gemessen und der Durchschnittswert ermittelt.

13.2 Linearität
Die Linearität dieses Tests wurde durch Messung einer seriellen Verdünnungsreihe einer Serumprobe bestätigt. Regressionsanalyse: $y = 0.91x + 1.07$ *(mg/L),* $r^2 = 0.984$ (y = gemessene Freie-Lambda-Konzentration, x = theoretische Konzentration).

13.3 Interferierende Substanzen
Durch Zugabe von 200mg/L Bilirubin (1,95%), 5,0g/L Hämoglobin (4,90%) und und (15000 formazine turbidity units) Chylus (-7,41%) zu einer Freien-Lambda-Kontrolle (57,1mg/L) wurde eine geringfügige Interferenz verursacht.

13.4 Leerwert- und Nachweisgrenze
Die untere Nachweisgrenze diese Tests ist durch den niedrigsten Punkt der Kalibrationskurve definiert, z.B. 4,91mg/L in der 1/20 Standardverdünnung.

13.5 Vergleichsstudien
Es wurden mit 95 normalen und 30 klinschen Proben (von Patienten mit bekannter Diagnose oder Verdacht auf Multiples Myelom und Systemischer Lupus erythematodes) eine Vergleichsmessung mit **Freelite** auf dem MININEPHPLUS und **Freelite** auf dem BNII. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

	Normale und klinische Seren
Bereich (mg/L)	7,90 – 8680
Passing Bablok Regression (mg/L)	1,03x – 1,36
Lineare Regression R^2	0,9798

14 REFERENZEN

1. Cole PW, Durie BGM, Salmon SE. (1978) Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
2. Pescali E, Pezozoli A, (1988) The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
3. Solling K, Solling J, Romer FK. (1981) Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
4. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR. (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RJ (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**:4, 673-680.
6. Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')$_2$-based, latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. Clin. Chem **46**:6, Suppl. 2000, 705, pA181.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT. (2003) Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
8. Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
9. Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J.Haem. **122**: 78-84.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002) Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA. (2002) Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
12. Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5th Edition, 221-228. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
13. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Heamatol. **126**, 348-354.

Coffret Lambda Libre Humaine Freelite™ pour utilisation sur MININEPHPLUS™

Pour un usage en diagnostic *in vitro*

Code produit : VK018

Produit fabriqué par :
The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.
www.bindingsite.co.uk

Distribué en France par la société :
The Binding Site Group Ltd, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève Cedex.
Téléphone : 04.38.02.19.19
Fax : 04.38.02.19.20
e-mail : info@bindingsite.fr

MININEPHPLUS™ et **Freelite**™ sont des marques déposées par The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK.

CE

1 INDICATIONS

Ce coffret permet de quantifier les chaînes légères libres lambda dans le sérum sur le MININEPHPLUS. La mesure des taux de chaînes légères libres apporte une aide au diagnostic et au suivi des myélomes multiples, des néoplasmes lymphocytaires, des macroglobulinémies de Waldenström, des amyloses AL, des maladies de dépôt des chaînes légères et des maladies des tissus connectifs comme le lupus érythémateux disséminé en corrélation avec d'autres résultats de laboratoire et clinique.

2 PRESENTATION GENERALE

Les molécules d'immunoglobulines sont constituées de deux chaînes lourdes identiques (α, δ, ε, γ ou μ) qui définissent la classe de l'immunoglobuline et de deux chaînes légères identiques (κ ou λ). Chaque chaîne légère est attachée par des liaisons covalentes aux chaînes lourdes qui sont liées de façon covalente par la région charnière. Chez les patients sains, la majorité des chaînes légères dans le sérum sont liées aux chaînes lourdes. Cependant, les chaînes légères libres (ChLL) sont trouvées à de faibles taux dans le sérum des sujets normaux. Ceci est dû à une surproduction et sécrétion des ChLL par des plasmocytes. Bien que le poids moléculaire des deux chaînes légères soit d'environ 22,5kD, la chaîne libre κ (κChLL) existe de façon prédominante sous forme monomérique et la chaîne libre λ (λChLL) sous forme dimérique liée de façon covalente avec un poids moléculaire d'environ 45kD. Ceci induit un taux de filtration glomérulaire différentiel pour κChLL et λChLL et peut expliquer le rapport sérique κChLL / λChLL observé de 0,625 comparé au taux de chaînes légères liées κ/λ de 2,0.

Des taux sériques élevés de chaînes légères libres monoclonales sont associés à une prolifération maligne de plasmocytes (ex. myélomes multiples), à l'amylose AL et à la maladie de dépôt des chaînes légères. Des taux sériques élevés de chaînes légères libres polyclonales peuvent être associés à des maladies auto-immunes telles que le LED [(1-13)].

3 PRINCIPE

L'évaluation de la concentration d'un antigène soluble par néphélémétrie nécessite l'ajout de l'échantillon à une solution d'anticorps approprié dans une cuvette. Un faisceau de lumière traverse la cuvette et comme la réaction antigène-anticorps se produit, la diffusion de la lumière augmente au cours de la formation des complexes immuns insolubles. La lumière diffusée est mesurée par de la diminution de l'intensité lumineuse de la lumière incidente. L'anticorps dans la cuvette est en excès pour que la quantité de complexes immuns formés soit proportionnelle à la concentration d'antigène. Les concentrations sont calculées automatiquement à partir de courbe étalon pré-établi enregistrée sur la carte de calibration. La sensibilité des tests en néphélémétrie peut être augmentée par l'utilisation de particules chimique liées à l'anticorps [(6)]. Lorsque l'anticorps est accroché à des particules de taille convenable, il y a augmentation du signal de la lumière diffusée relative à la réaction antigène-anticorps.

4 REACTIFS

4.1 Réactif latex lambda libre humaine : Anticorps mono spécifique lié à des microparticules de polystyrène. Fourni sous forme lyophilise. Le reconstituer avec 0,75mL d'eau distillée et le mettre en agitation sur un agitateur automatique pendant 30 minutes avant utilisation. Il contient les conservateurs suivants : 0.099% d'azide de sodium, 0,05% de ProClin™, 0,1% d'Acide-E-amino Caproïque (EACA) et 0,01% de benzamidine.

4.2 Carte magnétique lambda libre : Elle contient les détails de la courbe de calibration spécifique de chaque lot de produits. Cette carte est spécifique d'un lot de produits et doit être utilisée uniquement avec ce lot.

4.3 Tampon lambda libre : Il doit être utilise uniquement avec le réactif latex lambda, la carte magnétique et les contrôles du même lot. Il contient 0,099% d'azide de sodium en tant que conservateur.

4.4 Contrôlés lambda libre humaine : Sérums mélangés contenant des chaînes légères libres (ChLL) polyclonales lambda. Fournis sous forme liquide stable. Conservateurs : 0,099% d'azide de sodium, 0,1% EACA, et 0,01% benzamidine. Les gammes de valeurs de concentrations acceptables pour les contrôles lambda libre humaine sont inscrites sur le certificat de contrôle qualité (VIN018.QC) joint au coffret.

ProClin™ est une marque déposée de Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

5 PRECAUTIONS

Tous les sérums des donneurs humains ont subi un dépistage négatif pour les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag Hbs. Les tests utilisés ont été clarifiés pour une utilisation en diagnostic *in vitro* en Europe (Directive 98/79/EC, Annexe II) et aux Etats-Unis par la FDA ; toutefois, ces tests ne peuvent garantir l'absence totale d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être manipulés et éliminés comme des produits potentiellement infectieux. Seul un personnel qualifié portant les équipements de protection personnels adéquats et formé à la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux est autorisé à utiliser ce coffret.

Ce produit contient de l'azide de sodium et ProClin 300 et doit être manipulé avec précaution, ne pas ingérer ou mettre en contact avec la peau ou les muqueuses (spécialement en cas de blessure). En cas de contact, rincer à grande eau et consulter un médecin. L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre pour former des azides de métaux explosifs. Il est nécessaire d'ajouter de grands volumes d'eau pour éviter la formation d'azides.

Ce réactif doit être utilisé par un personnel formé. Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. **La validité des résultats obtenus en utilisant des paramètres autres que ceux indiqués ne peut être garantie.**

Les réactifs des coffrets ayant des numéros de lots différents **NE SONT PAS** interchangeables. Si de grandes séries de tests doivent être réalisées, vérifier que tous les réactifs aient le même numéro de lot. La substitution de certains réactifs peut induire des résultats incorrects.

6 STOCKAGE ET STABILITE

Le coffret non ouvert doit être stocké à 2-8°C et ce jusqu'à la date de péremption figurant sur son étiquette. NE PAS CONGELER. Une fois reconstitué, le réactif latex lambda libre humain est stable 5 jours s'il est conservé à 2-8°C. Il est recommandé d'utiliser les flacons de réactif l'un après l'autre. Le tampon doit être laissé à température ambiante avant utilisation. Une fois ouverts, le tampon et les contrôles sont stables 1 mois s'ils sont conservés à 2-8°C.

7 PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Utiliser du sérum frais ou congelé. Les sérums doivent être prélevés par ponction veineuse en laissant le caillot se former puis en séparant le sérum dès que possible afin d'éviter l'hémolyse. Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C jusqu'à 21 jours avant les tests ou congelés à -20°C. Pour une conservation prolongée, ils doivent être gardés à -20°C ou à une température inférieure. Les congélations/décongélations successives doivent être évitées. Les échantillons de sérums contaminés par des bactéries ou contenant des particules, des lipides ou de l'hémoglobine ne doivent pas être utilisés. Certains types de sérums ne sont pas appropriés pour un test sur MININEPHPLUS, se référer au paragraphe 11.1.1.

8 METHODOLOGIE

Note : pour une interprétation complète des résultats, le rapport kappa/lambda doit être déterminé, les échantillons doivent par conséquent aussi être testés en utilisant le coffret Binding Site kappa libre **Freelite** sur MININEPHPLUS (VK016).

8.1 Matériel fourni

8.1.1 2 x 0,75mL *Human Lambda Free Reagent (Réactif Latex Lambda Libre)*
8.1.2 1 x 3,5mL *Lambda Free Supplementary Buffer (Tampon Lambda Libre)*
8.1.3 1 x 0,5mL *Human Lambda Free High Control (Contrôle Haut Lambda Libre)*
8.1.4 1 x 0,5mL *Human Lambda Free Control (Contrôle Lambda Libre)*
8.1.5 Carte magnétique contenant les informations pour la calibration spécifique au lot.
8.1.6 Certificat de Contrôle Qualité
8.1.7 Fiche Technique

8.2 Matériels requis mais non fourni

8.2.1 Instrument MININEPHPLUS (AD500.C/.D/.E)
8.2.2 Imprimante MININEPHPLUS (AP1310DPK1T63) (Optionnelle)
8.2.3 Coffret Accessoires MININEPH (ZK500.R)
8.2.4 Du Tampon Embarqué 1 MININEPHPLUS (On-Board Buffer 1 -SN107)
8.2.5 Des pipettes pour réaliser des dépôts de 5 à 1000µL
8.2.6 Des cônes pour la pipette MININEPHPLUS appropriés. Se référer au manuel d'utilisation du MININEPHPLUS.
8.2.7 Equipement pour la collecte et la préparation des échantillons
8.2.8 Un agitateur automatique
8.2.9 Eau distillée

8.3 Procédure de test

8.3.1 Récapitulatif des volumes de réactifs ajoutés dans la cuvette :

Réactif	Volume ajouté
Echantillon (dilué au 1/20)	40µL
Tampon Lambda Libre	100µL
Réactif Latex Lambda Libre Humaine	40µL

8.3.2 S'assurer qu'il y a suffisamment de tampon chargé à bord de l'automate (On-Board Buffer 1 -SN107) pour la réalisation des tests. Se référer au manuel d'utilisation du MININEPHPLUS pour rajouter du tampon.
8.3.3 Vérifier que le récipient à déchets est disposé à l'arrière du MININEPHPLUS sous la pipette et qu'il est vide.
8.3.4 Mettre un cône à la pipette et reposer la pipette sur son support.
8.3.5 Mettre l'automate sous tension.
8.3.6 *Entrer numéro paramètre*. Sélectionner le numéro 18 (LAM=18) puis valider sur la touche **enter.**
8.3.7 *Introduire la carte*. Ce message n'apparaît que lors de la première utilisation du canal ou si vous souhaitez changer de numéro de lot. Glisser la carte dans le lecteur de gauche à droit avec la bande magnétique vers le haut. Faire un mouvement horizontal.
8.3.8 *Vérifier numéro de lot réactif*. Valider en appuyant sur **enter**.
8.3.9 *LAM Lot xxxx OK ? 1= O (Oui) 2 = N (Non)*. Vérifier que les informations affichées correspondent bien à celles disponibles sur l'étiquette du réactif et passer la carte. Si le numéro de lot affiché correspond à celui du réactif et de la carte magnétique, sélectionner Y (presser **1**) et continuer l'étape 8.3.10. Si le numéro de lot ne correspond pas à celui du réactif sélectionner N (presser **2**) et retourner à l'étape 8.3.7 de façon à rentrer les données correctes.
8.3.10 *Amorçage? 1=O 2=N.* Amorcer l'automate pour expulser les bulles d'air contenues dans les tubulures allant du tampon chargé embarqué à la pipette. Ceci est fait en pressant la touche **1** lorsque demandée. Le tampon excédant sera rejeté dans le flacon déchets. Lorsque l'amorçage est terminé presser la touche **2**.
8.3.11 *Block N Pipette N*. Attendre la chauffe complète de l'appareil. La température de chauffe correcte fait partie des informations contenues dans la carte magnétique.
8.3.12 Préparer les dilutions des contrôles et des échantillons en utilisant le diluant pour MININEPH fourni dans le coffret accessoire réactif du MININEPH (ZK500.R). La dilution de l'échantillon recommandée pour Lambda est 1/20 (pour la préparer pipeter 40µL d'échantillon, et ajouter 760µL de diluant).
8.3.13 Préparer une cuvette pour MININEPH pour chacun des échantillons à tester. Placer un aimant dans chacune des cuvettes à l'aide d'une pince. Ensuite, déposer très délicatement 40µL d'échantillon dilué au fond de chaque cuvette.
8.3.14 *Identification patient*. Entrer un numéro d'identification (par ex.1) pour le premier échantillon à tester et presser **enter** pour continuer (se référer au manuel d'utilisation pour le choix des codes d'identification).
8.3.15 *Dilution Echant 1/20.* Accepter la dilution recommandée en pressant sur **enter** ou taper un nouveau facteur de dilution si une dilution alternative doit être utilisée.
8.3.16 *Placer cuvette dans la chambre*. Placer la cuvette contenant le barreau aimanté et les 40µL d'échantillon dilué dans la chambre de lecture. Descendre la cuvette jusqu'au fond ainsi la cuvette sera détectée automatiquement.
8.3.17 *Stabilisation en cours*. L'échantillon dans la cuvette positionnée à l'intérieur de l'automate est chauffé pendant 90 secondes.
8.3.18 *Ajouter le réactif.* En utilisant la pipette du MININEPHPLUS, aspirer le réactif latex lambda libre humaine.
8.3.19 *Bulle d'air.* Aspirer une bulle d'air séparatrice à l'aide de la pipette du MININEPHPLUS.
8.3.20 *Supplémentaire.* Aspirer ensuite le tampon Lambda Libre.
8.3.21 *Ajouter le réactif.* Déposer le contenu complet de la pipette dans la cuvette. Le MININEPH détecte l'addition des réactifs, la solution est agitée puis la mesure démarre. 30 secondes de blanc sont nécessaires. Le test durera ensuite 150 secondes. Le résultat sera ensuite affiché. Les résultats seront automatiquement imprimés si l'imprimante est connectée à l'automate.
8.3.22 Si l'automate affiche un résultat supérieur à la gamme de mesure (affichage de > ou mg/L XS), retester l'échantillon en le diluant au 1/200 (900µL de diluant échantillon MININEPH + 100µL d'échantillon dilué au 1/20). La dilution de l'échantillon devra être entrée en tant que 1/200 (voir paragraphe 10.2).
8.3.23 Une fois le test achevé, retirer la cuvette et presser sur **enter** pour procéder au test suivant.
8.3.24 Lorsque tous les tests ont été réalisés pour un paramètre, presser sur échap (**esc**) et sélectionner un autre numéro d'analyse pour la prochaine série de test sur un autre paramètre.
8.3.25 Vider le flacon déchets et jeter le cône de la pipette du MININEPHPLUS.

9 CONTROLE QUALITE

Les contrôles fournis doivent être utilisés dans chaque série. Les gammes acceptables de concentration lambda libres sont indiquées sur le certificat de contrôle qualité joint (VIN018.QC). Les résultats obtenus lors d'un test ne doivent être acceptés que si les résultats des contrôles sont dans les gammes indiquées.

Si la valeur d'un contrôle est en dehors des limites acceptables en utilisant une courbe en mémoire, il est nécessaire de le retester. Si après un deuxième test, les valeurs du contrôle sont toujours en dehors des limites, l'automate doivent être vérifiés et le test répété. Si le problème persiste contacter le fournisseur.

10 INTERPRETATION DES RESULTATS

10.1 Les résultats sont calculés par l'instrument et affichés en mg/L. Si l'imprimante est connectée, le résultat est automatiquement imprimé en précisant le numéro d'identification de l'échantillon et la dilution utilisée. Aucun autre calcul est nécessaire.

10.2 Tous les échantillons doivent être mesurés en premier en utilisant la dilution échantillon standard 1/20 donnant une gamme approximative de 4.91-98.3 mg/L. Pour les échantillons dilué au 1/20 et mesurés supérieurs à la limite haute de la courbe, nous suggérons de faire les dilutions comme indiqué dans le tableau ci-dessous afin de minimiser les volumes des réactifs utilisés.

Dilution totale échantillon	Echantillon (µL)	Diluant (µL)	Gamme de mesure lambda approximative (mg/L)
1/20	40µL de l'échantillon pur	760µL	4.91-98.30
1/200	100µL de la dilution 1/20	900µL	49.1-983.0
1/2000	100µL de la dilution 1/200	900µL	491-9830
1/20000	100µL de la dilution 1/2000	900µL	4910-98300

10.3 Excès d'antigène :
Le MININEPHPLUS suit la réaction cinétique de chaque échantillon et compare les résultats avec les limites de la réaction déterminée par le test d'une collection importante d'échantillons de myélome. Les échantillons détectés en excès d'antigène sont marqués d'une alerte (mg/L XS) dans les résultats et doivent être remesurés à une dilution d'échantillon supérieure (voir paragraphe 11.1.3).

10.4 La stabilité des échantillons n'est pas garantie lorsqu'ils sont dilués. A la dilution 1/20, les échantillons sont stables 2 heures à 21°C. A des dilutions supérieures, l'échantillon devra être immédiatement testés après avoir été préparés.

11 LIMITES

11.1 Limites relatives au test

11.1.1 Les tests en néphélémétrie ne sont pas applicables pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés ou pour des échantillons contenant des taux élevés de complexes immuns circulants, à cause du degré imprévisible de déviation de lumière non spécifique que de tels échantillons peuvent générer. Des résultats inattendus doivent être confirmés en utilisant une autre méthode.
11.1.2 Un diagnostic ne peut pas être fait et un traitement ne peut pas être donné uniquement sur la base des mesures de chaînes légères libres. L'histoire clinique du patient ainsi que d'autres analyses doivent être prises en considération.
11.1.3 **Excès d'antigène** : Un nombre réduit d'échantillon de patient contenant de fortes concentrations en chaînes légères libres kappa ou lambda, peuvent donner des résultats anormalement bas pour la chaîne légère impliquée à cause d'un excès d'antigène. La composition en acides aminés de la chaîne légère produite par un clone individuel de cellules B influencera le niveau auquel un échantillon pourra présenter un excès d'antigène avec les tests **Freelite**. Dans une très grande majorité de cas, la concentration de la chaîne légère impliquée a une valeur supérieure aux valeurs normales (3,30-19,40mg/L pour kappa libre et 5,71-26,30mg/L pour lambda libre) et/ou la concentration de la chaîne légère opposée a une valeur inférieure aux valeurs normales et/ou le rapport kappa libre sur lambda libre est en dehors des valeurs normales (0,26-1,65). Si une des conditions ci-dessous est rencontrée, un échantillon devra être testé à la dilution initiale 1/20 et à la dilution 1/200 pour détecter tout excès d'antigène.

a) l'échantillon a soit une concentration en CLL ou un rapport CLL kappa/CLL lambda en dehors des gammes de mesures
b) l'échantillon provient d'un patient ayant déjà présenté un excès d'antigène
ou
c) les résultats de l'échantillon ne sont pas en adéquation avec les autres résultats cliniques.

11.1.4 Les ChLL possèdent une combinaison unique d'acides aminés. Ainsi, il est théoriquement possible que certaines protéines monoclonales soient indétectables par immunoessai, provoquant des résultats plus faibles que prévus. En pratique cela ne se produit que très rarement avec le test **Freelite**. Les échantillons suspects doivent d'abord être testés pour l'excès d'antigène (voir paragraphe 11.1.3 ci-dessus) puis par d'autres techniques d'analyse (immunofixation et électrophorèse des protéines sériques).
11.1.5 Dans les essais immunoenzymatiques, la nature des protéines monoclonales peut causer une réponse non linéaire et, potentiellement donner des résultats contradictoires. Ceci peut être évité en diluant les échantillons comme suit : 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000. Ne pas omettre une de ces dilutions.
11.1.6 La nature des protéines monoclonales est très variable, c'est pourquoi des lots de réactifs différents peuvent réagir différemment aux épitopes présents dans certains sérums. Dans ces cas, les résultats d'un sérum peuvent varier s'ils ont été obtenus sur des lots différents. En suivi de patients, les résultats doivent être interprétés avec précaution si les lots sont différents. Nous recommandons, dans la mesure du possible, d'utiliser un même lot lorsque plusieurs échantillons doivent être comparés.

11.2 Causes d'erreur

Problème	Cause(s) possible(s)	Actions suggérée
Message d'erreur "Blanc trop haut - retester" affiché	Concentration très élevée de l'échantillon	Retester l'échantillon à une dilution supérieure
	Echantillon lipidiques, troubles ou hémolysés	Trouver une autre technique de test
Contrôles en dehors des gammes acceptées.	Détérioration des produits	Vérifier la date d'expiration
	Erreur opérateur	Répéter le test en utilisant la dilution de l'échantillon appropriée
Le tes d'un échantillon donne un faible résultat inattendu	Excès d'antigène	Répéter le test à une dilution supérieure. Vérifier la concordance des résultats.

12 VALEURS ATTENDUES

Les gammes de valeurs indiquées ci-dessous ont été obtenues à partir d'un nombre limité d'échantillons et sont données à titre indicatif. Il est fortement recommandé d'établir ses propres normes.

12.1 Gammes adultes sériques

282 sérums d'adultes sains âgés de 20 à 90 ans ont été testés en utilisant les tests **Freelite** Binding Site pour BN™II [11]. Les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous :

Sérum Adultes normaux	Conc. moyenne	Conc. médiane	Gamme 95 percentile
Kappa Libre	8.36 (mg/L)	7.30 (mg/L)	3.30 - 19.40 (mg/L)
Lambda Libre	13.43 (mg/L)	12.40 (mg/L)	5.71 - 26.30 (mg/L)
	Moyenne	**Médiane**	**Gamme totale**
Rapport Kappa/Lambda	0.63	0.60	0.26 - 1.65

**BN™ est une marque déposée de Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*

13 PERFORMANCES

13.1 Précision

Lambda précision sommaire				
	Conc. (mg/L)	Intra-lots CV en % (n=20*)	Inter-jours CV en % (n=10**)	Inter-instruments CV en % (n=5***)
Sérum 1	80,54	5,1	6,7	6,1
Sérum 2	29,42	3,9	3,8	5,1
Sérum 3	7,62	3,2	7,4	6,5

* Précision intra-lots : Le tableau ci-dessous résume les valeurs de coefficient de variation (CV) obtenues lors des intra-tests (20 fois le test de 3 concentrations d'échantillon différentes).
** Précision inter-jours : Les mesures on été réalisées sur 10 jours. Le CV total pour les résultats des tests des échantillons à chaque concentration a été calculé.
*** Précision inter-instruments : Les tests ont été réalisés en duplicat pour trois concentrations différentes sur 5 instruments. Le Cv des résultats pour chaque concentration a été calculé.

13.2 Linéarité

La linéarité de ce test a été confirmée en utilisant des dilutions en série d'un sérum polyclonal. L'équation de régression obtenue est $y = 0.91x + 1.07$ *(mg/L),* $r^2 = 0.984$ (y = concentration mesurée de lambda libre, x = concentration théorique).

13.3 Interférences

Des interférences minimes ont été trouvées avec la bilirubine à 200mg/L (1,95%), l'hémoglobine à 5,0g/L (4,90%) et le chyle à 15000 unités de turbidité de formazine (-7,41%) en utilisant un sérum de contrôle lambda libre à 57,1mg/L.

13.4 Limite de Détection et Limite du Blanc

La limite de quantification et de détection de ce test est définie an tant que point le plus bas de la courbe de calibration c'est-à-dire 4,91 mg/L pour une dilution d'échantillon à 1/20.

13.5 Comparaison

90 sérums adultes normaux et 30 sérums adultes pathologiques (connus ou suspectés atteints de myélome ou de lupus érythémateux systémique) ont été testés avec les coffrets **Freelite** sur le MININEPHPLUS et le BNII. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Sérums normaux et sérums cliniques
Gamme (mg/L)	7,90 – 8680
Régression de Passing Bablok (mg/L)	1,03x – 1,36
Régression linéaire R^2	0,9798

14 REFERENCES

1. Cole PW, Durie BGM, Salmon SE. (1978) Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
2. Pescali E, Pezozoli A, (1988) The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
3. Solling K, Solling J, Romer FK. (1981) Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
4. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR. (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RJ (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**:4, 673-680.
6. Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')$_2$-based, latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. Clin. Chem **46**:6, Suppl. 2000, 705, pA181.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT. (2003) Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
8. Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
9. Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J.Haem. **122**: 78-84.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002) Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA. (2002) Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
12. Bradwell AR (2006). Serum Free Light Chain Analysis, 4th Edition, 221-228. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
13. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Heamatol. **126**, 348-354.

Kit Freelite™ Lambda Libre Humana para uso en el MININEPHPLUS™

Para uso diagnóstico *in-vitro*

Código de producto: VK018

Producto fabricado por:
The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Spain S.L.U.,
C/ Balmes 243 4º 3ª, 08006 Barcelona
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es
web: www.bindingsite.es

MININEPHPLUS™ y **Freelite™** son marcas de The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK.

CE

1 APLICACIÓN

Este kit tiene como objetivo la cuantificación en suero de las cadenas ligeras libres lambda en el MININEPHPLUS. El análisis de las distintas cantidades de cadenas ligeras libres es de gran ayuda en el diagnóstico y monitorización del mieloma múltiple, neoplasias linfocíticas, la macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis primaria, síndrome de deposición de cadenas ligeras y enfermedades del tejido conjuntivo como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico, junto con otras determinaciones clínicas y de laboratorio.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las moléculas de inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas idénticas (α, δ, ε, γ o μ) que definen el tipo de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras idénticas (κ o λ). Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada y las dos cadenas pesadas están entre si enlazadas covalentemente en la región bisagra. En el suero de individuos sanos la mayoría de las cadenas ligeras se presentan ligadas a la cadena pesada. Sin embargo, también se encuentran niveles bajos de cadenas ligeras en el suero de individuos sanos, ya que las células plasmáticas las producen y segregan en exceso. El peso molecular de ambas cadenas ligeras es de aproximadamente 22,5kD. En el suero se encuentra la cadena ligera libre Kappa (κ) mayormente como monómero, la cadena ligera libre Lambda (λ) como dímero covalentemente ligado, con un peso molecular de aproximadamente 45kD. Esto conlleva a índices de filtración glomerular distintos para κ y λ, lo que podría ser una posible explicación para la relación κ / λ de 0,625 en el suero comparada con la relación κ ligada / λ ligada de 2,0.

Una concentración elevada de las cadenas ligeras libres monoclonales en suero está asociada con la proliferación maligna de células plasmáticas (por ejemplo mieloma múltiple), AL amyloidosis y la deposición de cadenas ligeras. Con enfermedades autoinmunes como el SLE pueden aparecer unas concentraciones elevadas de cadenas ligeras libres policlonales en suero. [1-13].

3 PRINCIPIO

Para la determinación de la concentración de un antígeno soluble mediante nefelometría se añade la muestra a una cubeta de reacción que contiene una solución con el anticuerpo correspondiente. Durante la reacción antígeno-anticuerpo un rayo de luz pasa a través de la cubeta y su difusión aumenta mientras que se forman complejos inmunológicos insolubles. La difusión de la luz se detecta midiendo la intensidad de la luz en un ángulo a parte de la luz incidente. El anticuerpo en la cubeta está en exceso, por tanto la cantidad del complejo inmunológico formado es proporcional a la concentración del antígeno. Las concentraciones se calculan automáticamente en referencia a la curva de calibración almacenada en la tarjeta de calibración. La sensibilidad de los tests nefelométricos o turbidimétricos puede aumentar con el uso de partículas de látex[6]. Esto comporta la unión del anticuerpo a una partícula de tamaño adecuado para obtener el aumento de la difusión del rayo de luz durante la reacción antígeno-anticuerpo.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivo lambda libre humana: Anticuerpo monoespecífico, el cual se ha fijado a micropartículas de poliestireno. Suministrado en forma liofilizada. Antes de usar, reconstituir con 0,75mL de agua destilada y poner en un mezclador de rodillo durante 30 minutos. Conservante incluido: 0.099% de azida sódica, 0.05% de ProClin™, 0.1% de ácido E-amino-n-caproico (EACA) y 0.01% de benzamidina.

4.2 Tarjeta magnética lambda libre: Está codificada con detalles de la curva de reacción específica del respectivo lote de reactivo. Es específica de lote y sólo se debe utilizar con el lote de reactivo indicado.

4.3 Buffer suplementario lambda libre: Para uso exclusivamente con el mismo lote de reactivo Lambda Libre, tarjeta magnética y controles exclusivamente. El buffer suplementario contiene 0,099% de azida sódica como conservante.

4.4 Controles: Sueros humanos normales con cadenas ligeras libres policlonales Lambda . Se suministran en forma líquida estable. Conservante: 0,099% de azida sódica, 0,1% de EACA y 0,01% de benzamidina. Los rangos de concentraciones aceptables de Lambda Libre Humana están indicados en el Certificado de Control de Calidad específico de lote (VIN018.QC) que acompaña al kit.

ProClin™ es una marca de Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

5 PRECAUCIONES

Los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a tests de screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y a la presencia de anticuerpos frente a los virus HIV1, HIV2 y HCV. Las técnicas usadas están aprobadas por la FDA (USA) o aprobadas para el diagnóstico *in vitro* en la UE (Directiva 98/79/EC, Anexo II); sin embargo dichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. Deben establecerse métodos de manipulación y eliminación adecuados para todos los materiales potencialmente infecciosos. Use guantes y vestuario protector adecuado en todo momento al manipular este producto. Los procedimientos deben ser accesibles sólo a personal experto y autorizado.

Este producto contiene azida sódica y ProClin 300 y debe ser manipulados con precaución. No trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas (especialmente si hay heridas). En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida.

El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado. **No se garantizan resultados válidos obtenidos utilizando parámetros diferentes que los indicados.**

Los reactivos de diferentes lotes **NO** son intercambiables. En caso de realizar un número elevado de tests, averigüe que todos los reactivos sean del mismo lote.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit sin abrir debe conservarse a 2-8°C, y puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. NO CONGELAR. Una vez reconstituido, el reactivo es estable durante 5 días si se conserva a 2-8°C. Antes de usar, se debe dejar equilibrar el buffer suplementario a temperatura ambiente. Se recomienda el uso consecutivo de los viales de reactivo. Una vez abiertos, el buffer suplementario y los controles son estables durante 1 mes si se conservan a 2-8°C.

7 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Utilizar muestras de suero frescas o congeladas. Las muestras de sangre se han de obtener por punción en vena, dejar que coagule de modo natural y separar el suero lo antes posible para prevenir la hemólisis. El suero se conserva a 2-8°C hasta 21 días, o se congela a -20°C para periodos más largos. Se deben evitar ciclos de congelación y descongelación repetidos. No deben utilizarse muestras hemolizadas, lipémicas, con contaminación microbiana o muestras que contengan partículas. Algunos tipos de suero no son adecuados para los ensayos MININEPHPLUS – ver sección 11.1.1.

8 METODOLOGÍA

Nota: para una interpretación completa de los resultados se deben determinar los ratios kappa/lambda libre, por lo que las muestras han de ensayarse también con el kit **Freelite** Kappa Libre MININEPHPLUS de Binding Site (VK016).

8.1 Material suministrado

8.1.1 2 x 0,75mL *Human Lambda Free Reagent* (Reactivo Lambda Libre Humana)
8.1.2 1 x 3,5mL *Lambda Free Supplementary Buffer* (Buffer Suplementario Lambda Libre)
8.1.3 1 x 0,5mL *Human Lambda Free High Control* (Control Alto Lambda Libre Humana)
8.1.4 1 x 0,5mL *Human Lambda Free Control* (Control Lambda Libre Humana)
8.1.5 Tarjeta magnética específica de lote con información sobre la calibración
8.1.6 Certificado de control de calidad
8.1.7 Hoja de instrucciones

8.2 Materiales necesarios pero no suministrados

8.2.1 Analizador MININEPHPLUS (AD500.C/.D/.E)
8.2.2 Impresora MININEPHPLUS (AP1310DPK1T63) (Opcional)
8.2.3 Conjunto de accesorios MININEPH Reagent (ZK500.R)
8.2.4 Buffer On-Board MININEPHPLUS 1 (SN107)
8.2.5 Conjunto de pipetas con capacidad para dispensar 5-1000µL
8.2.6 Puntas de pipeta para uso con MININEPHPLUS – consulte el manual del usuario de MININEPHPLUS
8.2.7 Materiales necesarios para la recolección y preparación de las muestras
8.2.8 Un mezclador de rodillo
8.2.9 Agua destilada

8.3 Procedimiento de ensayo

8.3.1 Resumen de volúmenes de reactivo que se han de añadir a la cubeta:

Reactivo	Volumen añadido
Muestra (dilución 1/20)	40µL
Buffer Suplementario Lambda Libre	100µL
Reactivo Lambda Libre Humana	40µL

8.3.2 Asegúrese de que hay suficiente Buffer On-Board 1 para llevar a cabo las pruebas. Consulte las instrucciones para reponer el buffer en el manual del usuario MININEPHPLUS.
8.3.3 Compruebe que el cubo de residuos está situado bajo el soporte para pipetas manuales en la parte posterior del MININEPHPLUS y que está vacío.
8.3.4 Ponga una punta a la pipeta manual y vuélvala a poner en el soporte para pipetas.
8.3.5 Encienda el analizador.
8.3.6 *Entre número de técnica*. Introduzca el número de parámetro (LAM = 18) y pulse **enter**.
8.3.7 *Pase la tarjeta específica.* Este mensaje sólo aparecerá si el parámetro en cuestión no se ha utilizado antes o si desea cambiar el número de lote del reactivo. Pase la tarjeta magnética por el lector en línea recta de izquierda a derecha a lo largo de la parte delantera del analizador, con la banda magnética hacia arriba.
8.3.8 *Compruebe número de lote*. Pulse **enter.**
8.3.9 *Lote LAM xxxx. OK? 1=S 2=N.* Compare los detalles mostrados en pantalla con los de la etiqueta y banda magnética. Si el número de lote en pantalla coincide con los del vial y banda magnética, seleccione S (pulse **1**) y continúe con el paso 8.3.10. Si el número de lote del vial es distinto al mostrado en pantalla seleccione N (pulse **2**) y vuelva al paso 8.3.7 para permitir la entrada de los datos correctos del lote.
8.3.10 *¿Cebar? 1=S 2=N.* Cargue el analizador para expulsar las burbujas de aire del tubo de plástico que va del vial de buffer On-board a la pipeta manual. Esto se hace pulsando el botón **1** cuando se indique. Se expulsará el exceso de buffer On-board en el cubo de residuos. Cuando acabe de cebar pulse **2.**
8.3.11 *Bloqueo N Pipeta N.* Deje que el analizador pase a temperatura ambiente de funcionamiento. La temperatura de funcionamiento correcta está codificada en la tarjeta de calibración.
8.3.12 Prepare diluciones de los controles y muestras utilizando el diluyente de muestras incluido en el conjunto de accesorios estándar MININEPH (ZK500.R). La dilución de muestra recomendada para Lambda es 1/20 (para preparar esta dilución pipetee 40µL de muestra en un tubo de dilución de muestra y añada 760µL de diluyente).
8.3.13 Prepare una cubeta MININEPH para cada muestra a ensayar. Ponga una barra magnética de agitado utilizando las pinzas suministradas con el MININEPHPLUS y luego pipetee cuidadosamente en el fondo de cada cubeta 40µL de muestra diluida.
8.3.14 *Identifique muestra*. Introduzca un código de identificación (ej. 1) para la primera muestra a ensayar y presione **enter** para continuar (vea el manual de usuario para la elección de códigos de identificación).
8.3.15 *Dilución de muestra 1/20.* Acepte la dilución recomendada pulsando **enter** o escriba un nuevo factor de dilución si se ha de utilizar una dilución alternativa.
8.3.16 *Ponga la cubeta en la cámara*. Coloque una cubeta con una barra de agitado y 40µL de muestra diluida en la cámara de cubeta. Presione la cubeta hacia abajo cuidadosamente hasta que llegue al fondo de la cámara. La cubeta será detectada automáticamente.
8.3.17 *Estabilizando temperatura.* Hay un tiempo de espera de 90 segundos para que se acondicione la temperatura de la muestra de la cubeta en el analizador
8.3.18 *Añada reactivo.* Aspire el reactivo Lambda humana con la pipeta manual MININEPHPLUS.
8.3.19 *Burbuja de aire.* Aspire un hueco de aire con la pipeta manual MININEPHPLUS.
8.3.20 *Aspirar reactivo suplementario.* Aspire el Buffer Suplementario Lambda Libre con la pipeta manual MININEPHPLUS.
8.3.21 *Añada reactivo*. Dispense los reactivos aspirados en la cubeta. Tras la rotación de la barra de agitado comenzará el ensayo. Después de 30 segundos de tiempo para el blanco, el ensayo necesitará 150 segundos para su finalización. El resultado se mostrará e imprimirá (si la impresora está conectada) automáticamente.
8.3.22 Si el instrumento indica que el resultado es superior al del rango de medida (mostrado como > or mg/L XS), vuelva a ensayar la muestra a una dilución superior de 1/200 (900µL de diluyente de muestra MININEPH + 100µL de muestra diluida a 1/20). La dilución de muestra se ha de introducir como 1/200 (vea la sección 10.2).
8.3.23 Una vez finalizado el ensayo, retire la cubeta y pulse **enter** para llevar a cabo el ensayo siguiente.
8.3.24 Cuando se han terminado todos los ensayos para el parámetro escogido pulse escape (**esc**) y seleccione el número de parámetro para el siguiente grupo de ensayos.
8.3.25 Vacíe el cubo de residuos y retire la punta de la pipeta manual.

9 CONTROL DE CALIDAD

Se deben incluir los controles suministrados en todos las series de ensayos. Los rangos aceptables de concentración lambda libre están indicados en el certificado de control de Calidad que acompaña al producto (VIN018.QC). Los resultados obtenidos en la serie solo pueden aceptarse si los resultados del control se encuentran dentro de los rangos indicados.

Si una medida de control queda fuera del rango cuando se ensaya con una curva de calibración guardada, el control debe analizarse de nuevo. Si los valores de control medidos vuelven a quedar fuera de rango, se deben comprobar el instrumento antes de repetir en ensayo. Si los problemas persisten, contacte con su distribuidor.

10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 El instrumento calcula los resultados y los indica en mg/L. Si se ha conectado una impresora el resultado se imprime automáticamente junto al código de identificación del paciente y la dilución de muestra. No son necesarios cálculos adicionales.

10.2 Todas las muestras se deben analizar primero a la dilución estándard de 1/20, dando un rango de medición aproximado de 4,91-98,3mg/L. Para las muestras que estén por encima del límite superior de la curva en una dilución del instrumento de 1/20, deberán ser realizadas las siguientes series de diluciones manuales para reducir al mínimo el uso de reactivos.

Dilución total	Muestra (µL)	Diluyente salino (µL)	Rango aproximado Lambda (mg/L)
Dilución de muestra 1/20	40µL de muestra neta	760µL	4,91-98,30
Dilución de muestra 1/200	100µL de la dilución 1/20	900µL	49,1-983,0
Dilución de muestra 1/2000	100µL de la dilución 1/200	900µL	491-9830
Dilución de muestra 1/20000	100µL de la dilución 1/2000	900µL	4910-98300

10.3 Exceso de antígeno:
El MININEPHPLUS monitoriza la reacción cinética inicial de cada muestra y compara los resultados con los límites de reacción establecidos mediante el análisis de una extensa variedad de mielomas. Las muestras en las que se detecta exceso se marcan (mg/L XS) y se deben volver a medir con una dilución de muestra superior (ver la Sección 11.1.3).

10.4 Al estar diluidas, no se garantiza la estabilidad de las muestras. A una dilución de 1/20 las muestras con estables durante 2 horas a 21°C. Las muestras a las que se hayan efectuado diluciones superiores deben utilizarse inmediatamente después de la preparación.

11 LIMITACIONES DEL MÉTODO

11.1 Limitaciones específicas del ensayo

11.1.1 Los ensayos nefelométricos no son adecuados para la determinación de muestras altamente lipémicas o hemolíticas o muestras que contengan niveles altos de complejos inmunes circulantes (CIC), dado que estas muestras pueden producir una cantidad impredecible de luz dispersa no especificable. Los resultados no previstos deberán verificarse con un método alternativo.
11.1.2 No debe realizarse el diagnóstico ni iniciarse un tratamiento basándose únicamente en la medida de las cadenas ligeras libres, deben tenerse en cuenta también la historia clínica y resultados de otras pruebas de laboratorio.
11.1.3 **Exceso de antígeno**: Un exiguo número de muestras de pacientes que contienen concentraciones elevadas de cadenas libres Kappa o cadenas libres Lambda puede dar resultados falsos bajos para la cadena ligera en cuestión debido al exceso de antígeno. La composición aminoácida de las cadenas ligeras producidas durante una condición patológica de la célula B influirá el nivel, en correspondencia del cual, una muestra puede evidenciar, con el ensayo **Freelite**, un exceso de antígeno. En casi todos los casos la concentración de la cadena ligera presente en cantidad elevada resultará arriba del rango de normalidad previsto (3.30-19.40mg/L para kappa libre y 5.71-26.30mg/L para lambda libre) y/o la concentración de la cadena ligera opuesta resultará debajo del rango de normalidad previsto y/o la relación de las cadenas Kappa libre/Lambda libre resultará fuera del rango previsto (0.26-1.65). Cualquier muestra deberá ensayarse a las diluciones de 1/20 y 1/200 para detectar el exceso antigénico si se da cualquiera de las siguientes condiciones:

a) Cualquier muestra que manifieste una concentración de cadenas ligeras libres o una relación Kappa libre/Lambda libre fuera del rango previsto,
b) cualquier muestra que provenga de un paciente que previamente haya manifestado exceso antigénico,
o
c) un resultado que no concuerde con los otros datos clínicos o de laboratorio.

11.1.4 Cada CLL contiene combinaciones únicas de aminoácidos. Por lo tanto es posible que algunas proteínas monoclonales sean indetectables por inmunoensayo, teniendo como consecuencia mediciones inferiores a las esperadas. En la práctica esto ocurre en raras ocasiones con el análisis **Freelite**. Primero se debe analizar si las muestras sospechosas contienen exceso antigénico (ver sección anterior 11.1.3) y posteriormente someterlas a análisis adicionales (inmunofijación y electroforesis de proteínas séricas).

11.1.5 La naturaleza de las proteínas monoclonales puede ocasionar una respuesta no lineal en inmunoensayos, pudiendo llevar a resultados inconsistentes; esto se puede prevenir diluyendo siempre las muestras en la secuencia 1/20, 1/200, 1/2000, 1/20000. Se debe evitar la omisión de algún paso de dilución.

11.1.6 Debido a la naturaleza altamente variable de las proteínas monoclonales, los reactivos de diferentes lotes podrían reaccionar de distintas formas a los epítopos en algunas muestras. En estos casos, los resultados podrían variar al usar multiples lotes. Se debe extremar la precaución al monitorizar pacientes con reactivos de lotes distintos. Se recomienda, siempre que sea posible, que se analicen las muestras actuales y antiguas con los lotes nuevos y que se comparen los resultados.

11.2 Resolución de problemas

Problema	Causas(s) posible(s)	Acción(es) sugerida(s)
Se muestra el mensaje de error "Blanco alto – repetir".	Concentración de analito muy elevada.	Ensayar la muestra a dilución superior.
	Muestras lipémicas, turbias o hemolizadas.	Utilice un método analítico alternativo.
Controles fuera de rango.	Producto deteriorado.	Compruebe la fecha de caducidad.
	Error del operario.	Repetir el ensayo con la dilución de muestra correcta.
Muestra con valor inferior al esperado.	Exceso de antígeno.	Repetir en ensayo a una dilución superior. Comprobar si los dos resultados concuerdan.

12 RESULTADOS ESPERADOS

Los rangos de valores indicados a continuación se obtuvieron comenzando de un número limitado de muestras y deben considerarse únicamente como un ejemplo. Se recomienda crear su propios rangos locales.

12.1 Rangos de valores en suero de adultos

Se analizaron los sueros de 282 sujetos sanos con edades comprendidas entre los 20 y los 90 años con los kits **Freelite** de Binding Site para BN™II* [11]. Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Suero adulto normal	Conc. media	Conc. mediana	Rango percentil 95
Kappa libre	8,36 (mg/L)	7,30 (mg/L)	3,30 – 19,40 (mg/L)
Lambda libre	13,43 (mg/L)	12,40 (mg/L)	5,71 – 26,30 (mg/L)
	Media	**Mediana**	**Rango total**
Relación Kappa/Lambda	0,63	0,60	0,26 – 1,65

**BN™ es una marca de Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*

13 CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

13.1 Precisión

Lambda precision sumario				
	valor medio (mg/L)	**intra-lote CV% (n=20*)**	**día a día CV% (n=10**)**	**inter-instrumento CV% (n=5***)**
Suero 1	80,54	5,1	6,7	6,1
Suero 2	29,42	3,9	3,8	5,1
Suero 3	7,62	3,2	7,4	6,5

*Precisión intra-lote: estos datos representan el coeficiente de variación (CV) de veinte mediciones intra-lote a tres concentraciones de analito.
**Precisión día a día: se llevaron a cabo los ensayos en diez ocasiones separadas y se calculó la CV total de los resultados a cada concentración.
***Precisión inter-instrumento: se llevaron a cabo los ensayos a tres concentraciones distintas, por duplicado en cada uno de los cinco instrumentos. Se calculó la CV media de los resultados a cada concentración.

13.2 Linearidad

La linearidad de este ensayo se confirmó analizando una serie de diluciones de un suero policlonal, que dio la recta de regresión $y = 0,91x + 1,07$ (mg/L), $r^2 = 0,984$ (y = concentración medida de lambda libre, x = concentración teórica).

13.3 Sustancias interferentes

En una medición de control de 57,1mg/L de lambda libre se encontraron interferencias insignificantes en 200mg/L de bilirrubina (1,95%), 5,0g/L de hemoglobina (4,90%) y (15000 formazine turbidity units) quilo (-7,41%).

13.4 Límite del blanco y límite de detección

El límite de cuantificación de este ensayo se define como el punto inferior de la curva de calibración (ej. 4.91mg/L basado en una dilución de muestra de 1/20).

13.5 Estudio comparativo

Se llevó a cabo un estudio de correlación con 95 sueros normales procedentes de adultos y 30 sueros clínicos (procedentes de pacientes con mieloma múltiple diagnosticado o sospechado y pacientes con lupus eritematoso sistémico) usando los kits **Freelite** para MININEPHPLUS y **Freelite** para BNII. Los resultados fueron los siguientes:

	Suero normal y suero de casos clínicos
Rango (mg/L)	7,90 – 8680
Regresión Passing Bablok (mg/L)	1,03x – 1,36
Regresión lineal R^2	0,9798

14 BIBLIOGRAFÍA

1. Cole PW, Durie BGM, Salmon SE. (1978) Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
2. Pescali E, Pezozoli A, (1988) The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
3. Solling K, Solling J, Romer FK. (1981) Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
4. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR. (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RJ (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**:4, 673-680.
6. Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of $F(ab')_2$-based, latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™II. Clin. Chem **46**:6, Suppl. 2000, 705, pA181.
7. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT. (2003) Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
8. Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
9. Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J.Haem. **122**: 78-84.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002) Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
11. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA. (2002) Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
12. Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5th Edition, 221-228. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
13. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Heamatol. **126**, 348-354.